

(3)

AN 1989-035957 [05] WPIDS

DNC C1989-015739

TI Gamma-substd.- beta-hydroxy butyric acid ester(s) - by treating  
gamma-substd. aceto acetic acid ester with reducing enzyme.

DC B05 D16

PA (ELED) DENKI KAGAKU KOGYO KK

CYC 1

PI JP 63309195 A 19881216 (198905)\* 8p <--

JP 2566962 B2 19961225 (199705) 5p

ADT JP 63309195 A JP 1987-145587 19870611; JP 2566962 B2 JP 1987-145587  
19870611

FDT JP 2566962 B2 Previous Publ. JP 63309195

PRAI JP 1987-145587 19870611

AN 1989-035957 [05] WPIDS

AB JP 63309195 A UPAB: 19930923

Gamma-substd.-beta-hydroxybutyric acid esters are produced by treating  
gamma-substd. acetoacetic acid ester with reducing enzyme having power to  
reduce gamma-substd. acetoacetic acid ester into gamma-substd.-beta-  
hydroxybutyric acid ester in aq. medium in the presence of organic solvent  
which may form duo-phase with water. Organic solvent r may be esters,  
alcohols, aromatic cpds., ethers or halogenised hydrocarbons.

USE/ADVANTAGE - Gamma-substd.-beta-hydroxybutyric acid esters (HBE)  
are useful as intermediates for the synthesis of calnithin.

In an example, culture medium (pH 6.0, 5 ml) comprising glucose (5 wt%); corn steep liquor (5 wt%) was put into a test tube, *Sporobolomyces* *Salmonicolor* IFO 1038 was inoculated into the culture medium. The mixt. was cultured at 28 deg.C for two days. The same compsn. of culture medium (100 ml) was put into flask, seed culture liquor (5 ml) was inoculated, resultant mixt. was subjected to shaken culture at 28 deg.C for four days. Bacteria body was collected by centrifugal sepn., washed with 0.01 M phosphoric acid buffer soln. (pH 7.0), adjusted whole volume to 10 ml with the buffer soln..

pulverised by ultrasonic wave pulverisation under ice-cooling at 20 KHz for 5 mins and prod. was used as crude enzyme liquor for reaction. NADPH (300 micro mols.) as coenzyme, substrate ethyl gamma-chloroacetoacetate (300 micro mols.) and ethyl acetate (10 ml) were added into crude enzyme liquor (10 ml), pH . was adjusted to 8 and reaction was initiated at 30 deg.C with stirring. After 20 hrs organic layer and aq. layer were sepd. out, aq. layer fraction was extracted with ethyl acetate (5 ml) twice. Ethyl acetate fraction was mixed with the extract, mixt. was dehydrated over anhydrous sodium sulphate, and conc. to give ethyl gamma-chloro beta-hydroxybutyrate.

0/0

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
**Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (JP)

特許公報 (B2)

(11)特許番号

第2566962号

(45)発行日 平成8年(1996)12月25日

(24)登録日 平成8年(1996)10月3日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C12P 7/62

識別記号

厅内整理番号

F1

C12P 7/62

(21)出願番号 特願昭62-145587

(22)出願日 昭和62年(1987)6月11日

(65)公開番号 特開昭63-309195

(43)公開日 昭和63年(1988)12月16日

(73)特許権者 99999999

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

山田 秀明

京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

清水 昌

京都市中京区西ノ京伯楽町14

三好 照三

町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社中央研究所内

加藤 正明

町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社中央研究所内

守川 忠志

町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社中央研究所内

審査官 谷口 博

(54)【発明の名称】 $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルの製造法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】水性媒体中で、 $\gamma$ -置換アセト酢酸エステルを $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルに還元する能力を有する還元酵素を用い、 $\gamma$ -置換アセト酢酸エステルから $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルを製造するに際し、水と二相を形成しうる有機溶媒を存在させることを特徴とする該 $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルの製造法。

【請求項2】水と二相を形成しうる有機溶媒がエスチル類、アルコール類、芳香族類、エーテル類又はハロゲン化炭化水素類である特許請求の範囲第(1)項記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

(産業上の利用分野)

近年、種々なオキシ酸類の医・農薬合成中間体として

の有用性が認識されつつある。本発明は、これらオキシ酸類のうち、カルニチン合成の中間体となる $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルの効率的製造法に関する。

【従来の技術】

従来、 $\gamma$ -置換アセト酢酸エステル(以下、AAEと言う)を還元酵素で $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステル(以下、HBEと言う)に変換するには水性媒体単独系が用いられて来た(特開昭59-118093号公報)。

【発明が解決しようとする問題点】

本発明者らは、水性媒体単独反応系での反応条件につき検討したが、HBEの蓄積濃度に限界があり、それ以上収量を上げるには多量の酵素及び補酵素を要する上、かえつて収率の低下をきたす等の問題があつた。

【問題点を解決するための手段】

本発明は、水性媒体中で、 $\gamma$ -置換アセト酢酸エステルを $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルに還元する能力を有する還元酵素を用い、 $\gamma$ -置換アセト酢酸エステルから $\gamma$ -置換- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エステルを製造するに際し、水と二相を形成しうる有機溶媒を存在させることを特徴とする該 $\gamma$ -置換-ハイドロキシ酪酸エステルの製造法である。

本発明に使用される有機溶媒の最低条件としては、

- (1) 基質AAE及び生成物HBEを溶解出来る
- (2) 水性媒体と二相を成しうる
- (3) 還元酵素に対する反応阻害性及び不活化作用が低い

ことが望ましい。具体的には、ギ酸エステル、酢酸エステル、プロピオン酸エステル、酪酸エステル等の有機酸エステル類、*n*-ブチルアルコール、*n*-アミルアルコール、*n*-オクチルアルコール等のアルキル基の炭素数4以上のアルコール類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族系溶媒類、ジエチルエーテル、メチルエチルエーテル、イソプロピルエーテル等のエーテル類、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素類などが挙げられる。反応系中におけるこれら有機溶媒類の水性媒体に対する使用比率は特に制限されないが、実用上、重量基準で有機溶媒/水性媒体=95/5~10/90の範囲が好ましい。

次にこれら二相媒体中で還元反応に用いる酵素源としては、AAEをHBEに変換する能力を有する酵素であつて、微生物菌体、菌体処理物、菌体より抽出した粗酵素及び精製酵素を使用できる。更に、これらを公知の方法で固定化した固定化物等も効果的に使用できる。具体的には、キヤンディダ属 (*Candida*)、サツカロマイセス属 (*Saccharomyces*)、トルロブシス属 (*Torulopsis*)、トリコスボロン属 (*Trichosporon*)、ピキア属 (*Pichia*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、ジオトリコム属 (*Geotrichum*)、エンドマイセス属 (*Endomyces*)、デバリオマイセス属 (*Debaryomyces*)、スプロボロマイセス属 (*Sporobolomyces*)等の酵母類、

- オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属
- アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属
- アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属
- アリストバクター (*Arthrobacter*) 属
- アモルフォスボランギウム (*Amorphosporangium*) 属
- アムブラリエラ (*Ampullariella*) 属
- ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属
- バチルス (*Bacillus*) 属
- コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属
- セルロモナス (*Cellulomonas*) 属
- エシエリキア (*Escherichia*) 属
- エンテロバクター (*Enterobacter*) 属
- フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属
- ハフニア (*Hafnia*) 属

クルチア (*Kurthia*) 属  
ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属  
ミクロコツカス (*Micrococcus*) 属  
メタノモナス (*Methanomonas*) 属  
メチロバシルス (*Methylobacillus*) 属  
ミクロビスピロラ (*Microbispore*) 属  
ミクロモノスピロラ (*Micromonospora*) 属  
ノカルジア (*Nocardia*) 属  
プロテウス (*Proteus*) 属  
シユードモナス (*Pseudomonas*) 属  
ペデオコツカス (*Pediococcus*) 属  
プラノモノスピロラ (*Planomonospora*) 属  
プロトモナス (*Protomonas*) 属  
ロドコツカス (*Rhodoccus*) 属  
セラチア (*Serratia*) 属  
ストレブトマイセス (*Streptomyces*) 属  
サーモアクチノミセス (*Thermoactinomyces*) 属  
キサントモナス (*Xanthomonas*) 属  
エルシニア (*Yersinia*) 属

20 に属するバクテリア類、さらにカビ類としてアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、ムコール属 (*Mucor*)、フサリウム属 (*Fusarium*)、リゾpus属 (*Rhizopus*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ノイロスピロラ属 (*Neurospora*)、ブルラリア属 (*Pullularia*)、ウスチラゴ属 (*Ustilago*)、バーテイシリウム属 (*Verticillium*)などがあげられる。

これら酵素源には、AAEを不斉的に還元し、(R)-HBE又は(S)-HBEを生成したり、また光学的に選択性がなく(R)体/(S)体が混合したHBEを生成するものもある。しかし、本発明の方法によれば、これら酵素源に限定されるものではなく、AAEをHBEに還元する反応には、上記以外でも適用可能である。

還元反応には、還元酵素以外に通常補酵素として還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (NADH) 又はニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を必要とするので、反応系に添加するかNADH又はNADPHを生成する反応システムを還元反応系中に共存させる必要がある。例えば、グルコースデヒドロゲナーゼによるグルコースからのグルコン酸生成反応におけるNADH又はNADPの各々NADH又はNADPHへの変換を利用するNADH又はNADPH再生システム等を好適に利用できる。

使用するAAEの種類に関しては、 $\gamma$ -位置換基としては、クロル、ブロム、フルオロ、アジド基などが、エステル基としては炭素数1~10のアルキル基が望ましい。

反応温度は5~70°C、好ましくは20~40°C、反応pHは4~10好ましくは6~8に調整すれば本発明の効果は十分に発揮される。かくして得られた反応液は二相が分離する迄静置するか、遠心分離機等で分離し、HBEの大部分を含有する有機層部分を集める。水層残存HBEは必要に応じ同一又は他の抽出溶媒等で回収することもでき

る。HBEを含有する有機層を合わせ硫酸ナトリウム等の脱水剤で脱水後、有機溶媒を減圧下で除去し、必要に応じ更に減圧蒸留又はクロマト分離等の処理をすれば純度の高いHBEが高収率で得られる。

以下、実施例で本発明を詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

〔実施例〕

実施例 1

グルコース 5重量%、コーン・ステイプ・リカーレ 5重量%から成る培地 (pH6.0) 5mlを試験管にとり、スプロボロマイセス・サルモニカラ (Sporobolomyces Salmonicolor) IFO1038を接種し、28℃で2日間培養した。これと同一組成の培地100mlを500ml容フラスコに取り、種培養5mlを接種し、28℃で4日間振とう培養を行なつた。遠心分離機により集菌し、0.01Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、同一緩衝液で全容10mlに調整し、氷冷下超音波波碎器により20KHzで5分間菌体を破碎したものを粗酵素液として反応に用いた。反応は粗酵素液10mlに捕酵素としてNADPH30μmol、基質γ-アクリルアセト酢酸エチル300μmol及び酢酸エチル10ml添加し、pHを8に調整後、30℃で攪拌下開始した。20時間後、有機層と水層を分け、水層区分を酢酸エチル5mlで2回抽出した。酢酸エチル区分を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮して油状物を得た。このものを減圧蒸留して、IR (島津製作所製IR-435)、NMR (日本電子社製PMX 60SI)、ガスクロマトグラフ (島津製作所製GC-9 APF、PEG 20M×1m、150℃、N<sub>2</sub> 30ml/分) で分析したところ、γ-アクリル-β-ハイドロキシ酢酸エチルであることを確認した。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) :

- 1.25 (3H, t)
- 4.20 (3H, q)
- 3.6 (2H, d)
- 3.2 (1H, br)
- 2.6 (2H, d)

比較のために、酢酸エチルを添加せず、水性媒体単独系で同一条件下反応させた結果も合せて第1表に示した。

第 1 表

反応系	残存γ-アクリルアセト酢酸エチル (%)	生成γ-アクリル-β-ハイドロキシ酢酸エチル (%)
酢酸エチル/水性媒体=1/1(重量)	6	92
水性媒体単独	0	52

実施例 2

第2表の各種有機溶媒を添加して反応した以外は実施例1と同様に行なつた。収率は第2表のとおりであつた。

第 2 表

有機溶媒	収率(%)
ギ酸エチル	87
酢酸ブチル	92
プロピオン酸メチル	85
n-ブタノール	77
n-オクタノール	94
ベンゼン	93
ジエチルエーテル	74
イソプロピルエーテル	88
クロロホルム	90
1,2-ジクロロエタン	90
四塩化炭素	78

実施例 3

第3表の菌株を用いた以外は実施例1と同様に行なつた。結果を第3表に示す。

第 3 表

菌株	収率(%)		光学純度 (%ee)
	酢酸エチル添加	水性媒体単独	
ロドトルラミニュタ IFO 0879(Rhodotulula minuta)	96	68	97
フザリウムオキシスポラムエフエスピバタタス (Fusarium oxysporum f. sp. batatas) IFO 4468	88	38	98
パエシロマイヤスマルカンディ IFO 7867(Paecilomyces marquandii)	92	49	99
バーテイシラムフンギコラ IFO 30616(Verticillium fungicola)	85	32	96

菌株	収率(%)		光学純度 (%ee)
	酢酸エチル添加	水性媒体単独	
アスペルジルスレウス IFO 4100( <i>Aspergillus terreus</i> )	80	28	98
セファロスポリウムアクレモニウム ATCC10141( <i>Cephalosporium acremonium</i> )	94	52	97

光学純度の測定は次によつた。

生成 $\gamma$ -クロル- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エチルと

(+)- $\alpha$ -メトキシ- $\alpha$ -トリフルオロメチルフェニル酪酸とのエステルを合成し、ジアステロマー化合物とした後、HPLC分析し、光学純度を算出した。

#### HPLC分析条件

カラム：パーティジル (Partisil 5 ( $\phi 4.6 \times 250$ mm, ワットマン社製)

第

4

表

移動相：ヘキサン：テトラハイドロフラン：メタノール = 600:100:1 (重量基準)

速 度: 2.0ml/分

検 出: 217nmでの吸光度

いずれも高い光学純度を有する (S) 一体であつた。

#### 実施例 4

第4表の菌株を用いた以外は実施例 1 と同様に行なつた。結果を第4表に示す。

菌株	収率(%)		生成物の (R)/(S)比
	酢酸エチル添加	水性媒体単独	
ミクロコッカスルテウス IFO 3064( <i>Micrococcus luteus</i> )	89	50	1.2
コリネバクテリウムグルタミカム ATCC1306( <i>Corynebacterium glutamicum</i> )	66	25	0.8
アリスロバクターシンプレックス IFO 12069( <i>Arthrobacter simplex</i> )	81	42	0.5
ロドコッカスコラリナス JCM 3199( <i>Rhodococcus corallinus</i> )	48	15	0.7
プラボバクテリウムエステロアロマティカム IFO 3851( <i>Flavobacterium esteraromaticum</i> )	50	21	0.9

生成した $\gamma$ -クロル- $\beta$ -ハイドロキシ酪酸エチルの光学活性分析は実施例 3 記載のHPLC法によつた。その結果 (R) 体と (S) 体の混合物であることが解つた。

#### 実施例 5

第5表の基質を用いた以外は実施例 1 と同様に行なつた。結果を第5表に示す。

第 5 表

AAE	HBE	収率(%)	
		酢酸エチル 添加系	水性媒体 単独系
$\gamma$ -クロル アセト酢酸 メチル	$\gamma$ -クロル- $\beta$ -ハイドロ キシ酪酸メチル	88	47
$\gamma$ -クロル アセト酢酸 エチル	$\gamma$ -クロル- $\beta$ -ハイドロ キシ酪酸エチル	92	52
$\gamma$ -クロル アセト酢酸 オクチル	$\gamma$ -クロル- $\beta$ -ハイドロ キシ酪酸オクチル	95	54
$\gamma$ -ブロモ アセト酢 酸エチル	$\gamma$ -ブロモ- $\beta$ -ハイドロ キシ酪酸エチル	82	42

AAE	HBE	収率(%)	
		酢酸エチル 添加系	水性媒体 単独系
$\gamma$ -フルオ ロ-アセト 酢酸エチル	$\gamma$ -フルオロ- $\beta$ -ハイド ロキシ酪酸エチ ル	79	40
$\gamma$ -アジド -アセト酢 酸エチル	$\gamma$ -アジド- $\beta$ -ハイドロ キシ酪酸エチ ル	90	51

#### 実施例 6

グルコース 5 重量%、コーン・ステイプ・リカーフ 5 重量%から成る培地 (pH6.0) 5mlを試験管に取り、スロボロマイセス・サルモニカーラ IFO1038を接種して28℃で2日間振とう培養を行ない種培養を得た。上記と同一組成の培地500mlを21容フラスコ10本に取り、種培養5mlを添加して28℃で4日間振とう培養を行なつた。

次に、5mlの培養液から遠心分離 (28000G, 20分間) で回収した培養菌体を0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄後、ダイノミル (シンマルエンターブライズ社製、ピーズ0.25~0.5mmφ) で20分間処理を行ない、28000Gで20分間遠心分離してケン渦物質を除き、粗酵素液を得

た。このものに硫酸アンモニウムを加えて60~80饱和%の画分を遠心分離(28000G×30分)により回収し、0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で20時間透析した。次にDEAE-セファセル(ファーマシア社製)カラムクロマトグラフィ(1.6φ×30cm)に吸着させ、上記緩衝液で洗浄後、塩化ナトリウム0~0.6Mを含む同緩衝液による直線グラジエント溶出を行なつた。活性を示した画分を集め、限外ろ過機(アミコン社、YM10)で濃縮し、グルろ過カラムクロマト(セファデツクス、G-100、2.0×90cm)に供給し、0.1MのNaClを含む上記緩衝液でクロマトグラフを行ない活性を示した画分を集めた。上記同様の方法でグルろ過クロマトグラフィを行ない精製酵素液を調製した。このものは電気泳動的に単一バンドを示した。かくして得られた精製酵素を使用し、第6表の条件下で反応した。結果を比較例と共に示す。

第 6 表

項目		実施例	比較例
反応組成 及び条件	精製酵素 (U)*	800	←
	グルコースデヒドロゲナーゼ(天野製薬製) (U)*	1070	←
	NADP (μモル)	8.4	←
	グルコース (μモル)	40	←
	γ-クロルアセト酢酸エチル (μモル)	36	←
	水性媒体(0.1Mリン酸緩衝液) (ml)	70	←
	酢酸エチル (ml)	100	0
	温度 (℃)	25	←
結果	pH(NaOHで調整)	7.0	←
	反応温時間 (時間)	48	60

項目	実施例	比較例
残存γ-クロルアセト酢酸エチル (μモル)	0	3.5
生成γ-クロル-β-ハイドロキシ酢酸エチル (μモル)	35	18.7
収率 (%)	97.2	51.9

\* 活性測定法: 基質600nモルとNADPH192nモルを0.6mlの酵素液(0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0)に添加し、37°Cにおける340nmの吸光度変化を測定し、求めた。

生成物を含有する酢酸エチルを無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧除去し、得られた無色液体を実施例1と同様に分析したところ、純度98%のγ-クロル-β-ハイドロキシ酢酸エチルであつた。また、このものを実施例3の方法で測定した光学純度は97%eeの(R)一体であつた。

## 〔発明の効果〕

本発明の方法によれば、従来の水性媒体単独系ではなしえなかつた高収率、高純度かつ高濃度のHBEを得ることができる。